

A Study of Synthesis and Application of Peptide 4-methylcoumaryl-7-amide as the Novel Fluorescent Substrates

著者	遅 弘放
巻	24
発行年	2014-03-25
その他のタイトル	新規な蛍光基質ペプチド4-メチルクマリン-7-アミドの合成と応用に関する研究
学位授与番号	17104甲生工第216号
URL	http://hdl.handle.net/10228/5251

氏 名	遅 弘放(中国)			
学 位 の 種 類	博 士(工学)			
学 位 記 番 号	生工博甲第216号			
学位授与の日付	平成26年3月25日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
学位論文題目	A study of synthesis and application of peptide 4-methylcoumaryl-7-amide as the novel fluorescent substrates (新規な蛍光基質ペプチド4-メチルクマリン-7-アミドの合成と応用に関する研究)			
論文審査委員会	委員長	教 授	玉川	雅章
		教 授	春山	哲也
		教 授	石黒	博
		教 授	花本	剛士
		教 授	鳥井	正史

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

ヒストンのアセチル化やメチル化等の修飾は、遺伝子発現の調整によってがんなどの疾病と関わるとして近年注目を集めている。本研究は、ヒストンの修飾によって遺伝子発現に関わる酵素群、ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）およびヒストンメチル化酵素（HMTs）の機能解明を主たる目的とした、新規な蛍光性基質の開発を行ったものである。開発した新規蛍光性基質は蛍光基としてクマリリン誘導体部分を含み、基質がペプチドの場合は末端に 7-アミノ 4-メチルクマリンを配したペプチド-MCA とし、各種のペプチド鎖によって特異性を発現させている。これらの新規蛍光性基質により、各酵素群の特性を明らかにした。またこの蛍光性基質の設計手法を応用し、歯周病の原因菌が遊離する酵素の活性を検出することが可能なペプチド-MCA の開発も行っている。

著者は本論文 1 章において、生体におけるヒストン修飾の重要性について、さらにはこのヒストン修飾に関わる HDACs と HMTs、およびこれらの活性を検出するための新規な蛍光性基質の必要性について記述している。また、これまでに判明しているヒストンの修飾についての整理も行っている。

続いて、第 2 章においては、HDACs の蛍光性基質の開発について述べている。HDACs の活性についての研究には、単にアセチル化された基質に限定せず、多様なアシル修飾された基質を用いることが有用である。そこで、一群の蛍光性基質 Ac-Lys(X)-MCA (X=Ac, Tf, Py, Pr, Pe, Df, Bu, Mp, Pf, Bz, Fo and Ca)を設計合成し、それによる HDACs の反応を調べた。その結果、Ac-Lys(Tf)-MCA は HDAC4 および HDAC5 の最も良い基質であり、Ac-Lys(Py)-MCA は HDAC1 および HDAC3 により良く切断されることを明らかにしている。

第 3 章では、メチル化ペプチドの設計合成に必要な新規なアミノ酸合成法について記述している。

ヒストン中のリシン側鎖のメチル化を研究するために、側鎖がメチル化された保護リシン残基 (Fmoc-L-Lys(Boc, Me)-OH および Fmoc-L-Lys(Me)₂-OH) を合成し、さらにこれを使用したペプチド Ac-ARTK(Me)-MCA および Ac-ARTK(Me)₂-MCA の合成について述べている。

さらに第4章では、HMTs 活性を調べるための蛍光基質の開発について述べている。修飾を受けるヒストンテールペプチドの配列をもとに、一群のペプチド-MCA を設計合成した。これを用いた HMTs (G9a および Set7/9) の活性についても評価している。

第5章では、ここまでで開発した新規 MCA 蛍光基質を簡便に測定するための装置である、EAAS-PD の開発について述べており、短時間で再現性良く MCA 蛍光基質による活性測定が行えることを示している。

第6章において、新規な蛍光性ペプチド-MCA 基質である iBoc-GGR-MCA を使用した、歯周病の原因菌の酵素であるジンジパインの活性検出について述べている。この基質を使用したジンジパインの活性と、歯周病の判定基準の一つである歯周ポケット深度が関連することを記述している。

第7章で、著者は本論文が明らかにしたことを簡潔にまとめている。

以上本論文では、ペプチド-MCA を中心とした新規設計蛍光性基質により、HDACs および HMTs の性質を明らかにし、さらにこれを用いた新しい歯周病治療の発展に応用可能であることも示している。

学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文に関し、調査委員からペプチド-MCA 基質が HDACs あるいは HMTs の活性により蛍光を発する機序について、またペプチド-MCA 基質の今後の応用について質問がなされたが、いずれも著者から満足な回答が得られた。

また、公聴会においても多数の出席者があり、ペプチド-MCA 型の基質を用いた理由、またこの基質の多様性について、など種々の質問がなされたが、いずれも著者の説明によって質問者の理解が得られた。

以上により、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（工学）の学位に十分値するものであると判断した。